

植物源提取物防治根结线虫的分子研究

秦 燕

(莱芜职业技术学院, 山东 莱芜 271100)

摘要: 针对内生真菌的生物防治, 重点阐述了中草药提取物的杀虫活性、植物抗线虫基因的发现以及植物防御系统激发的最新研究。植物源提取物作为潜在的线虫杀虫剂, 为生物源农药开发和利用提供新的思路。同时, 对于今后线虫杀虫剂开发中存在的问题及解决方案进行了探讨, 就其发展方向提出了建议。

关键词: 根结线虫; 线虫杀虫剂; SA 途径; JA 途径

中图分类号: S763.306.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 01-0018-05

Progress in The Biological Control of Root-knot Nematodes, *Meloidogyne incognita*

QIN Yan

(Laiwu Vocational and Technical College, Laiwu 271100, Shandong, China)

Abstract: This review focused on the recent findings concerning the biological control of root-knot nematodes, including the bio-control of *Meloidogyne incognita* by using antagonistic fungi, plant extracts and plant disease resistance genes. The review also provided an insight into the adaptation of nematode-parasitized immunocompetent plants, and provide the way for discovering new anti-parasitic strategies.

Key words: root-knot nematodes; nematicidal agents; SA pathway; JA pathway

根结线虫作为植物寄生线虫广泛分布, 因其破坏多种农业经济作物而集中研究, 其中根结线虫危害最普遍。传统的根结线虫的防治方法大多采用药剂防治, 筛选抗病品种等综合防治措施。其中化学杀线虫药剂由于可收到立竿见影的预期效果, 在根结线虫的防治上曾被广泛使用, 最近也有学者提出将天多虫和草氨酰由传统的喷洒叶片改为土壤滴灌早期控制线虫^[1-2], 但化学药剂的长期使用带来了一系列的副作用, 如破坏生态平衡、药剂残留造成水土污染等。符合现代农业可持续发展战略理念的生物防治方法成为根结线虫治理的首选措施。

生物防治作为植物病害管理的措施有其固有的优势。首先, 生物防治环保, 无污染、无或低残留,

在自然环境中降解快, 符合市场对绿色农产品的需求; 其次, 生物防治的作用机理大多是复合物的多重作用, 不易导致抗药性的产生; 另外, 对生物活性成分的深入研究有可能发现有价值的先导化合物, 促进新农药的开发, 因此近几年被广泛关注。

根结线虫生物防治主要包括根际真菌、根际细菌、放线菌、病毒、捕食性线虫等, 在这些天敌生物中, 研究最多的是根际细菌, 其余种类了解甚少。本文简单总结了根际真菌的最新进展, 其余种类在其他文献都有阐述。

1 植物根际真菌防治根结线虫

植物根际促生菌(简称 PGPR)是从植物根部分

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 莱芜职业技术学院科研基金项目

作者简介: 秦燕, 女, 讲师, 博士, 主要从事病虫害防治研究, E-mail: qinyan1024@163.com。

离出的微生物,借助其代谢产物,改善植物生长条件如通过固氮增加植物营养、加强植物的应激性、刺激植物根系发育、抑制有害微生物活动,改善土壤生态环境等。根际促生菌对植物的生物防治作用主要是通过产生嗜铁素,拮抗有害微生物的同化作用,诱导系统抗性实现的。所以,植物根际促生菌是抵御病原虫攻击植物根系的第一道屏障。

近年根际微生物的生物防治已成为一个研究热点。20世纪80年代以来的研究主要是侧重于专性寄生细菌和放线菌对线虫的生物防治。随着人们对线虫和根际真菌的进一步认识和了解,对真菌防治根结线虫的调查越来越多。根际真菌被认为是根结线虫生物防治的巨大资源宝库。植物内生真菌生活在植物组织内部,长期以来与宿主植物形成了紧密的共生关系,在植物病害防治与生物修复中均显出独特的优点。

用内生性真菌处理种子是最近几年发展出来的一种新型生物防治植物寄生虫的方法。在种子萌发初期,根比较小,真菌足以直接作用与根周围的根结线虫。真菌分泌的抗根结线虫的复合物能显著地抑制线虫穿透入植物根的内部,并能有效地激活植物的防御系统。在植物逐渐长大的过程中,根系逐渐发育,真菌与线虫之间的直接作用减低,但是被真菌激活的植物根系的防御系统可以继续发挥作用。用内生性真菌尖孢镰刀菌和根瘤菌分别接种西红柿根的不同部位,可诱导出植物特异的防御系统,从而抑制线虫的活性^[3]。另外,用内生性真菌 *Neotyphodium* 感染草的根系后可以抑制一些种类的寄生虫^[4-5]。

腐生性真菌 (*P. lilacinus* Samson) 可感染根结线虫的卵、胚胎和雌性个体,所以,在不同条件下都能实施生物防治。德国生产的已经成功用于防治线虫的产品 MeloConWG 也是来自 *P. lilacinus* 株 251。从植物的根中分离得到的无致病性的 *Fusarium* 株和 *Chaetomium* Ch1001 能明显的降低香蕉、西红柿、大米和黄瓜上的根结线虫^[6-9]。另外,真菌的 *Aspergillus* 和 *Penicillium* spp. 能产生多种次级代谢产物,表现出很强的生物防治植物寄生性线虫的潜力。

大多数研究中单独的一种生物防治剂只能控制一种病原菌,因为一种防治剂在土壤如此复杂的环境中不可能对抗所有攻击植物的病原菌。复合型生

物防治剂不仅可以为器官提供足够的养分,还可以高效地提高生物防治效率。Siddiqui ZA^[10]为了提高 PGPR 和真菌的效率,他们用促生菌 *P. putida* 或 *P. lilacinus* 与牛粪结合可以有效防治西红柿上的 *M. incognita*, 植物生长还可提高 79%。他们提出虽然肥料本身并不能减少线虫的虫瘿和繁殖,但是植物被线虫感染后大多表现出营养不良,而如果施用牛粪,就可为它们增加营养。植物器官充足的营养可有助于根际促生菌的繁殖和种群的巩固,从而抑制线虫,提高植物的抗性。

从枝菌根真菌和促生细菌,AM 真菌和 PGPR 双重接种比单独接种可更好地控制根结线虫,促进植物的生长。最近有人报道在西红柿上双接种丛枝菌根真菌和促生细菌后可抑制根结线虫,最好的搭配是 *G. mosseae* 和 *Bacillus* sp.。二者可相互促进,特异性抑制根结线虫和其它疾病^[11]。

目前用 PGPR 提高植物病原菌的防治有很好的应用前景。但是,由于生物防治菌株受到复杂的土壤生态因子的影响,生物防治菌剂防效的稳定性仍然得不到保证。随着分子生物学技术的发展,需要从以下几个方面着手更深层次的研究:(1)鉴定真菌到种的层次,(2)真菌如何与线虫发生作用,(3)如何激活植物的防御系统,(4)对种子处理的最佳剂量,(5)对根结线虫代谢途径的影响。

2 中草药作为线虫杀虫剂的研究进展

中草药除了作为药物还是生物活性化合物的宝库,植物体内所含有的化学成分以及产生的次生代谢产物都是宝贵的药用资源,它们是在长期进化过程中抵御病虫害形成的,往往具有某些特异的生物活性,为研究开发植物源杀虫剂提供了丰富的资源。

最新的研究结果表明很多植物中都存在一些抗线虫的成分。有人从半夏块茎中提取出来两种糖苷黄酮——夏佛托苷和异夏佛托苷,有很强的杀线虫的活性,半致死浓度 LC₅₀ 分别为 114.66 μg/mL 和 323.09 μg/mL^[12]。番荔枝种子中提取的番荔枝内酯抗体外也具有很强的抗线虫的活性^[13]。

Ntalli 实验室在这方面做了大量的工作,他们从楝树果实中提取出抗线虫的胺类物质和醛类物质,包括棕榈酸、己酸、乙酸以及糠醛、5-羟甲基糠醛、5-甲基糠醛,其中糠醛是首次报道的抗线虫活性最高的化合物;之后他们又从希腊生长的 8 个

种的唇形科植物中提取到8种精油和13种萜烯,其中牛至(*Origanum vulgare*)的精油具有很高的抗线虫的活性,萜烯中香芹酮的抗线虫活性最高,且明显高于精油类^[14-15]。2011年他们实验室又报道了从希腊本土生长的七种植物中提取出的萜烯对线虫的抑制作用。96 h EC₅₀数据表明7种植物中有4种植物的提取物可以有效杀死线虫,按强弱顺序依次为小茴香,洋茴芹,蜜味桉和笃耨香树。这些植物的提取物中苯甲醛是毒性最大的化合物,其次为 γ -桉叶油醇和草蒿脑。最有潜力的杀线虫的萜烯对是:反式茴香醚/香叶醇,反式茴香醚/丁香子酚,香芹酚/丁香子酚,香叶醇/香芹酚。

芸香科植物 *Ruta chalepensis* 提取物作为一种潜在的线虫杀虫剂可引起根结线虫(*M. incognita* 和 *M. javanica*) 麻痹死亡。其提取物化学分析表明主要成分是脂肪酮和香豆素两种复合物,在对线虫个体活性方面,最先挥发出来的抗线虫的成分是2-十一烷酮^[16-17]。

灯笼树是杜鹃花科的一种落叶灌木, Begum^[18] 分别研究了灯笼树(*Cordia latifolia*)果实、树皮、树叶中的成分抗根结线虫(*M. incognita*)的活性。结果发现,从树干和树叶中分离出来了两种新的成分: cordinoic acid 和 cordicilin; 从树干树皮中分离出包括 cordioic 和 cordifolic 在内的9种复合物; 从果实中分离到 latifolicin A、B、C、D 和 rosmarinic acid 5种; 从树叶中分离到 cordinol 和 cordicinol。这些提取物的结构通过1D和2D-NMR技术等都已确定出来。实验分析表明,所有这些成分在质量分数12.5g/L下作用72h均可导致线虫100%死亡。

3 寄主植物中抗线虫基因的研究

植物在受植食性昆虫危害时都会产生防御反应。系统获得抗性(SAR)一直被认为是植物防御反应中长期对抗线虫的法宝^[19]。SAR主要依赖于水杨酸途径(SA)和茉莉酮酸途径(JA)。研究发现JA途径与以下几个蛋白的表达密切相关,包括蛋白酶抑制因子、苯丙氨酸解氨酶、脂氧化酶,这些酶的主要作用是正向调节植物的次生代谢产物,诱导植物产生挥发性有机化合物实现的。Cooper^[20]报道了人工诱导JA途径,可以有效降低根结线虫在西红柿上的繁殖。

虽然根结线虫的繁殖方式是孤雌生殖,该线虫

具有很强的适应环境的能力,克服植物抗性基因的能力很高。它的世界性分布和广泛的寄主范围,再加上这种适应潜力使其成功地成为一种植物寄生虫^[21]。研究发现重复序列的获得和丢失可能是一种推动蛋白质多样性和进化的重要推动力,可以使其快速适应新的环境^[22-24],很好的例子是在植物抗性基因中发现富含亮氨酸重复序列家族,其中改变富含亮氨酸重复序列的长度可以有效推动其抗性^[25]。分泌蛋白MAP-1可能参与植物与线虫早期识别的功能^[26]。

根结线虫侵染过程中拟南芥中相关基因PR-1,2,5在根中均高效表达^[27],说明这些基因具有潜在的抗根结线虫的活性。拟南芥中NPR1基因SAR途径的正向调控者,还可调控SA和JA信号之间的干扰信号,在烟草中转基因表达拟南芥NPR1基因后增强了对根结线虫的抗性,另外,转基因植物表达AtNPR1后也表现出抗病原虫和食草动物的抗性^[28]。

Khallouk^[29]的研究发现櫻桃李中的Ma基因对所有的根结线虫均有很高的抗性,包括*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* 和 *M. enterolobii*。根结线虫侵入抗性李子后,二龄幼虫的数目未见增加,也未见其发育成三龄幼虫,同时也未能形成线虫的取食部位。

以上抗性基因的发现,对于研究线虫抗性品种提供了很好的理论依据。第一个抗甜菜包囊线虫的甜菜品种已通过转导Hstprol基因而培育出来,而且将很快进行田间试验。相信在不久的将来,将有更多的植物通过抗性基因工程而赋予抗性。线虫抗性品种的出现为农作物寄生线虫的生物防治提供一种新的有效途径。

4 存在的问题及解决方案

目前,生物源农药的研究多以有效植物的筛选、有效物质的粗提和相应的生物学试验特别是抑菌试验为主,对有效成分的鉴定及其作用机制研究不多且不够深入,这对充分发挥生物源农药的作用是十分不利的。虽然诸多研究表明植物作为药用资源开发具有广阔的前景,但是仍然存在一些问题,如生物源农药需要较高的使用浓度;不具备渗透性和内吸性,病菌一旦侵入植株内,提取物难以阻止病菌的扩展;植物提取物的持效期多只有几天,而随着

施药后间隔时间的延长,防效持续下降。针对以上存在的问题,如何利用助剂提高提取物在植株表面的展着并增加内吸效果及延长持效时间;确定提取物的活性成分;加强作用机制研究;对植物源药物广泛筛选,针对线虫建立相应的资源数据库;如何解决抗性品种抗性逐渐丧失的现象都是下一步工作需要研究的内容。

5 展望

根结线虫的生物防治工作已经取得了一定的进展,呈现出较好的发展趋势。随着分子生物学的发展,抗性基因的筛选和抗性品种的选育将是今后发展的大趋势。基于以上的思路,正在开展这方面的工作,我们比较了自由生活和寄生生活的线虫基因组,通过比较发现两种自由生活的线虫与动物寄生线虫的基因组序列存在着很大的差别,这说明寄生线虫为了适应其生活方式发展出来一套营寄生生活的许多基因,如在根结线虫基因组中发现了61个植物细胞壁降解的酶(如转化酶),这些酶只在植物寄生线虫和两个昆虫中存在,在其他后生动物中目前还没发现;根结线虫中还有很多其他的酶用来降解植物细胞壁,如21个纤维素酶、6个木聚糖酶、30个果胶裂解酶、20个破坏植物细胞壁非共价结合键的苹果菌素。对寄生虫和植物寄主的这些酶进行序列比对,寻找抑制剂靶位点可有望获得一种特异、高效、环保的线虫防治的新途径。

参考文献:

- [1] Desaegeer J A, Rivera M, Leighty R, et al. Effect of methomyl and oxamyl soil applications on early control of nematodes and insects[J]. *Pest Manag Sci*, 2011, 67(5): 7-13.
- [2] Fujimoto T, Tomitaka Y, Abe H, et al. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate[J]. *J Plant Physiol*. 2011. 168(10): 84-97.
- [3] Martinuz A, Schouten A, Sikora R. Systemically induced resistance and microbial competitive exclusion: implications on biological control[J]. *Phytopathology*. 2011, [Epub ahead of print].
- [4] West C P, Oosterhuis D M, Robbins R T. The effect of *Acremonium coenophialum* on growth and nematode infestation of tall fescue[J]. *Plant Soil*, 1988, 112(1): 3-6.
- [5] Bacetty A A, Snook M E, Glenn A E. Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scriberiri*[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(12): 1336-1345.
- [6] Niere B I. Significance of non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht: fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (cobb) thorne on tissue cultured banana[D]. Bonn Germany University of Bonn, 2001: 45-58.
- [7] Hallmann J, Sikora R A., Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte on *Meloidogyne incognita* infection of tomato[J]. *J Plant Dis Prot*, 1994, 101(4): 475-481.
- [8] Le T H, Padgham L J, Sikora R A. Biological control of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* on rice, using endophytic and rhizosphere fungi[J]. *Int J Pest Manage*, 2009, 55(1): 31-36.
- [9] Xiao-ning Yan, Richard A Sikora, Jing-wu ZHENG. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 2011, 12(3): 219-225.
- [10] Siddiqui Z A, Futai K. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure[J]. *Pest Manag Sci*, 2009, 65(9): 3-8.
- [11] Liu R, Dai M, Wu X. Suppression of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Mycorrhiza*, 2011, [Epub ahead of print].
- [12] Du S S, Zhang H M, Bai C Q, et al. Nematocidal flavone-C-glycosides against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) from *Arisaema erubescens* tubers[J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 79-86.
- [13] Le Dang Q, Kim W K, Nguyen C M. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, [Epub ahead of print].

- [14] Ntalli N G, Vargiu S, Menkissoglu-Spiroudi U, et al. Nematicidal carboxylic acids and aldehydes from *Melia azedarach* fruits[J]. J. Agric. Food Chem, 2010, 58, 11390-11394.
- [15] Ntalli N G, Ferrari F, Giannakou I, et al. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58, 7856-7863.
- [16] Ntalli N G, Manconi F, Leonti M et al. Aliphatic Ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) induce paralysis on root Knot nematodes[J]. Agric Food Chem, 2011, 59(13): 98-103.
- [17] Ntalli N G, Ferrari F, Giannakou I, et al. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece[J]. Pest Manag Sci, 2011, 67(3): 341-51.
- [18] Begum S, Perwaiz S, Siddiqui B S. Chemical Constituents of *Cordia latifolia* and their nematicidal activity[J]. Chem Biodivers, 2011, 8(5): 50-61.
- [19] Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance[J]. Annu Rev Phytopathol, 2004, 42: 185-209.
- [20] Cooper W R, Jia L, Goggin L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars[J]. J Chem Ecol, 2005, 31: 1953-1967.
- [21] Castagnone-Sereno P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity*. 2006. 96:282-289.
- [22] Garb J E, Hayashi C Y. Modular evolution of egg case silk genes across orb-weaving spider superfamilies[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 11379-11384.
- [23] Hayashi C Y, Lewis R V. Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene[J]. *Science*, 2000, 287: 1477-1479.
- [24] Rasteiro R, Pereira-Leal J B. Multiple domain insertions and losses in the evolution of the Rab prenylation complex[J]. BMC Evol Biol, 2007, 7: 140.
- [25] Ellis J, Dodds P, Pryor T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes[J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 278-284.
- [26] Castagnone-Sereno P, Jean-Philippe Semblat, Chantal Castagnone. Modular architecture and evolution of the map-1 gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. Mol Genet Genomics, 2009, 282:547-554.
- [27] Hamamouch N, Li C, Seo PJ, et al. Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection[J]. Mol Plant Pathol, 2011, 12(4): 355-64.
- [28] Priya D B, Somasekhar N, Prasad J, et al. Transgenic tobacco plants constitutively expressing Arabidopsis NPR1 show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*[J]. BMC Res Notes, 2011, 4: 231.
- [29] Khallouk S, Voisin R, Van Ghelder C, et al. Histological mechanisms of the resistance conferred by the Ma gene against *Meloidogyne incognita* in *Prunus spp*[J]. Phytopathology, 2011, 101(8): 945-51.